

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA
Bureau Int.

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRA

WO 9608716A1

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : G01N 27/447	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/08716 (43) Date de publication internationale: 21 mars 1996 (21.03.96)
---	----	---

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01176	(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Date de dépôt international: 14 septembre 1995 (14.09.95)	
(30) Données relatives à la priorité: 94/10928 14 septembre 1994 (14.09.94) FR	Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE [FR/FR]; F-60200 Compiègne (FR).	
(72) Inventeurs; et	
(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): VIJAYALAKSHMI, Mookambeswaren, A. [FR/FR]; 5, square Charles-Gounod, F-60200 Compiègne (FR). HAUPT, Karsten [DE/FR]; Appartement 292, 2, square Bernard-Palissy, F-60200 Compiègne (FR).	
(74) Mandataire: HAMMOND, William; Cabinet Hammond, 33, rue Vaneau, F-75007 Paris (FR).	

(54) Title: CAPILLARY AFFINITY ELECTROPHORESIS, AFFINITY MATRIX FOR IMPLEMENTING SAID ELECTROPHORESIS AND METHOD OF MANUFACTURE

(54) Titre: ELECTROPHORESE CAPILLAIRE D'AFFINITE, MATRICE D'AFFINITE POUR LA MISE EN ŒUVRE DE CETTE ELECTROPHORESE ET SON PROCEDE DE FABRICATION

(57) Abstract

Capillary affinity electrophoresis characterized by having, as the affinity carrier, an affinity ligand coupled to a soluble polymer such as polyethyleneglycol (PEG) or a derivative thereof.

(57) Abrégé

Electrophorèse capillaire d'affinité, caractérisée par le fait qu'on utilise comme support d'affinité un ligand d'affinité couplé à un polymère soluble, tel que le polyéthylène glycol (PEG) ou un de ses dérivés.

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettone	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mal	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbekistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

Titre : Electrophorèse capillaire d'affinité, matrice d'affinité pour la mise en oeuvre de cette électrophorèse et son procédé de fabrication.

La présente invention concerne un perfectionnement relatif à une technique d'analyse dite électrophorèse capillaire d'affinité, également dénommée électrophorèse capillaire haute performance (ECHP), et un support d'affinité pour la mise en oeuvre de cette technique et à un procédé pour la fabrication de ce support.

Cette technique d'analyse est actuellement réalisée au moyen d'un appareil qui consiste en un capillaire de silice, qui a un diamètre intérieur compris entre 25 et 100 µm, et dont chaque extrémité plonge dans des récipients remplis de tampons. Un voltage de l'ordre de 20 à 30 kV est appliqué par l'intermédiaire de deux électrodes plongeant dans ces récipients. En électrophorèse, l'homme du métier sait que des champs électriques élevés permettent des séparations rapides. Dans le cas de l'électrophorèse capillaire où l'injection et le volume de détection sont minimaux, le seul facteur d'élargissement des pics est dû à la diffusion axiale. Plus la rapidité de la migration des espèces chimiques à l'extérieur du capillaire est importante, plus les pics sont résolus. Cette vitesse électrique est obtenue pour des champs électriques de l'ordre de 150 à 300 V/cm.

Dans la technique d'électrophorèse capillaire d'affinité, l'homme du métier propose de remplir le capillaire d'un gel d'agarose couplé avec un ligand ou de réaliser une dérivatisation de la paroi du capillaire et d'y coupler le ligand.

Mais ces techniques connues d'électrophorèse capillaire d'affinité sont difficiles à mettre en oeuvre avec tous types de ligands bio-spécifiques, groupes spécifiques ou pseudo-bio-spécifiques, y compris les chélates métalliques tels que l'imminodiacétate de cuivre (II) ou IDA-Cu (II).

En particulier, cette technique actuelle a pour inconvénient le fait que le ligand reste fixé dans le capillaire : la régénération de ce dernier après chaque séparation peut se révéler être très difficile voire même impossible. Ceci est tout particulièrement le cas pour les chélates métalliques car un relargage du métal (du fait du champ électrique ou d'une grande affinité pour la protéine utilisée) ne pourra être compensée et les propriétés du capillaire seront par conséquent modifiées.

Aussi un des buts de la présente invention est-il de fournir une technique d'électrophorèse capillaire d'affinité qui permet de pallier ces inconvénients.

Un autre but de la présente invention est de fournir une telle technique d'électrophorèse permettant une préparation, une régénération et une stabilité satisfaisante du capillaire.

Ces buts, ainsi que d'autres qui apparaîtront par la suite, sont atteints par une électrophorèse capillaire d'affinité qui est caractérisée, selon la présente invention, par le fait qu'on utilise comme support d'affinité un ligand d'affinité couplé à un polymère soluble.

5 Avantageusement, le polymère soluble est le polyéthylène glycol (PEG) ou un de ses dérivés.

La présente invention a également pour but de fournir un support d'affinité pour la mise en œuvre de cette électrophorèse capillaire d'affinité ainsi qu'un produit pour la fabrication de ce support

10 Ce support d'affinité est constituée par un ligand d'affinité couplé à un polymère soluble par covalence.

15 Selon la présente invention; le polymère soluble est un composé organique aliphatique, à chaîne linéaire ou cyclique, non ramifié, biocompatible et ayant une masse supérieure à $4,996 \cdot 10^{-24}$ kg (3.000 daltons). La viscosité de ce polymère soluble est inférieure à 5 mPa.s. Par ailleurs, l'ultra-violet est faiblement absorbé par ce polymère, ce qui permet une détection des protéines à des longueurs d'onde comprises entre 214 et 280 nm.

Le polymère soluble est de préférence le polyéthylène glycol (ou PEG) ou un de ses dérivés, tel que le méthoxy-polyéthylène-glycol (ou m.PEG).

20 Le PEG présente une masse de l'ordre de $8,302 \cdot 10^{-24}$ kg. (5.000 daltons) et est linéaire et non ramifié. La viscosité est inférieure à 5 mPa.s. Il est soluble dans l'eau, le benzène, l'acetonitrile et, à chaud, dans l'acétone, le dioxane, le toluène, par exemple. On peut utiliser, jusqu'à une mole dans 5 % de PEG, différents additifs : soit des sels tels que le chlorure de sodium (NaCl), le sulfate de potassium (K_2SO_4), soit la glycine-bétaïne, ces additifs étant cités de façon non limitative.

25 Le couplage de différents ligands au PEG ou à des dérivés de celui-ci a été réalisé. Ceci est regroupé dans le tableau 1 ci-après.

Tableau 1

Dérivé du PEG	Groupe fonctionnel de ligand	Réaction de couplage
5 PEG-Cl	R HN R	Direct amine secondaire ou tertiaire
10 PEG-NH ₂	R-COOH	DCC, catalyse possible par HOBT dans des solvants organiques EDC, possible via NHS-ester dans H ₂ O
15 O	R-CHO (sucres, nucléotides)	Base de Schiff, réduite par Na BH ₄
20 PEG-O-CH ₂ -C-NH-NH ₂ (Hydrazide)	R-CHO (sucres, nucléotides)	pKa = 3, réaction possible en conditions acides
25 O	R-NH ₂ R-OH R-SH	Catalyse par amine, éther ou thioéther
30 PEG-O-OH ₂ -CH-CH ₂ -CHO R-NH ₂ (Aldehyde)	R-NH ₂	Base de Schiff, réduite par NaBH ₄
35 PEG-O-Succ PEG-O-CH ₂ -COOH (CM-PEG) PEG-Gly-OH (= dérivés carboxylés)	R-NH ₂	DCC, possible HOBT- catalyse possible par HOBT dans un solvant organique EDC, possible via NHS-Ester dans H ₂ O

On couple à ce polymère un ligand d'affinité tel que, par exemple, des lectines, des ions métalliques immobilisés. Le support d'affinité ainsi obtenu se présente sous forme liquide et constitue le tampon remplissant les récipients de l'appareil d'électrophorèse.

Deux exemples seront ci-après donnés à titre non limitatif, pour mieux faire comprendre les avantages de la présente invention.

45 Exemple 1 : PEG couplé à une lectine

On utilise comme support d'affinité du méthoxy-PEG-Succinyl-ConA afin de séparer les RNases A et B de pancréas bovin. Ces deux RNases ont des séquences identiques en acides animés, mais la RNase B est glycolysée en Asn 34 alors que la RNase A n'est pas glycolysée.

Dans le tableau 2 ci-après sont regroupés les résultats d'électrophorèse capillaire d'affinité réalisée l'une sans ligand d'affinité, l'autre avec le ligand d'affinité ci-dessus.

5 Tableau 2: Temps de migration des différentes protéines étudiées.

t_0 = temps de migration sans le ligand mPEG-Con A dans le méthoxy - PEG 5000

t = temps de migration avec le ligand mPEG-Con A dans le méthoxy - PEG 5000-IDA-Cu (II)

10	Protéine	t_0 (min)	t (min)	$t-t_0$ (min)
	RNase A	9,9	10,2	0,3
	RNase B	12,5	15,7	3,2

15 Il apparaît que les temps de migration sont bien distincts, ce qui se traduit lors de la mesure par l'obtention de pics bien identifiables.

Exemplaire 2 : PEG couplé à un ion métallique immobilisé

On utilise comme support d'affinité le méthoxy-PEG 5000 IDA-Cu (II) et comme support de référence le méthoxy PEG 5000.

20 Par électrophorèse on veut séparer les cytochromes c de cœur de thon, de cœur de cheval et de Candida Krusei : ces différentes espèces de cytochrome c sont des protéines qui ont sensiblement le même poids moléculaire et le même point isoélectrique. On sait qu'ils diffèrent, néanmoins, de par leurs nombres de résidus histidine accessibles en surface.

25 Dans le tableau 3 ci-après, sont regroupés les temps de migration de chaque cytochrome c en fonction du support utilisé.

Tableau 3 : Temps de migration des différents cytochromes étudiés

t_0 = temps de migration dans le méthoxy-PEG 5000

t = temps de migration dans le méthoxy-PEG 5000-IDA-Cu (II)

30	Protéine	t_0 (min)	t (min)a	$t-t_0$ (min)
	Cyt c de cœur de thon	12,6	12,6	0
	Cyt c de cœur de cheval	12,2	13,2	1,0
35	Cyt c Candida Krusei	17,3	20,5	3,2

a) Les valeurs sont corrigées en fonction des différences de flux électroosmotiques pour les deux supports polymères, avec ou sans ligand.

Il apparaît que la présence du ligand couplé permet une bonne identification des protéines de structure très voisine, leur caractérisation et, par suite, leur séparation.

REVENDICATIONS

1. Electrophorèse capillaire d'affinité, caractérisée par le fait qu'on utilise comme support d'affinité un ligand d'affinité couplé à un polymère soluble.

5

2. Electrophorèse capillaire d'affinité selon la revendication 1, caractérisée par le fait que le polymère soluble est du polyéthylène glycol (PEG) ou un de ses dérivés.

10

3. Support d'affinité pour électrophorèse capillaire d'affinité selon les revendications 1 ou 2, caractérisé par le fait qu'il est constitué par un ligand d'affinité couplé à un polymère soluble.

15

4. Support d'affinité selon la revendication 3, caractérisé par le fait que le polymère soluble est le polyéthylène glycol (PEG).

20

5. Procédé pour la préparation du support d'affinité selon les revendications 3 ou 4, caractérisé par le fait qu'on couple un ligand d'affinité à un polymère qui est soluble à température ambiante dans l'eau, le dichlorure de méthane, l'acetonitrile et, à chaud, dans l'acétone, le dioxane, le toluène et dont la masse est supérieure à $4,996 \cdot 10^{-24}$ kg et la viscosité inférieure à 5 mPa.s.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Appl. No
PCT/FR 95/01176

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N27/447

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US,A,5 108 568 (J. M. VAN ALSTINE) 28 April 1992 see abstract ---	1-5
Y	JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, vol. 597, 1992 AMSTERDAM, NL, pages 357-364, H. GOUBRAN-BOTROS 'IMMOBILIZED METAL ION AFFINITY ELECTROPHORESIS' see abstract ---	1-5
A	GB,A,1 500 464 (MARINE COLLOIDS, INC.) 8 February 1978 see page 2, line 9 - line 63 -----	1

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *'E' earlier document but published on or after the international filing date
- *'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *'D' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

1 December 1995

Date of mailing of the international search report

- 4. 01. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Duchatellier, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational Application No
PCT/FR 95/01176

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-5108568	28-04-92	NONE	
GB-A-1500464	08-02-78	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

	Dem. Internationale No PCT/FR 95/01176
--	--

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 G01N27/447
--

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE
--

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 G01N
--

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications vistées
Y	US,A,5 108 568 (J. M. VAN ALSTINE) 28 Avril 1992 voir abrégé ----	1-5
Y	JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, vol. 597, 1992 AMSTERDAM, NL, pages 357-364, H. GOUBRAN-BOTROS 'IMMOBILIZED METAL ION AFFINITY ELECTROPHORESIS' voir abrégé ----	1-5
A	GB,A,1 500 464 (MARINE COLLOIDS, INC.) 8 Février 1978 voir page 2, ligne 9 - ligne 63 -----	1

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- 'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- 'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- 'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- 'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- 'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- '&' document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

1 Décembre 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

- 4. 01. 96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Duchatellier, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALEDen. Internationale No
PCT/FR 95/01176

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US-A-5108568	28-04-92	AUCUN	-----
GB-A-1500464	08-02-78	AUCUN	-----

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.